

経口レニン阻害剤の開発研究

著者	厚海 修吾
号	355
発行年	1994
URL	http://hdl.handle.net/10097/15269

氏 名（本籍） あつ うみ しゅう ご
厚 海 修 吾

学 位 の 種 類 博 士 （ 薬 学 ）

学 位 記 番 号 薬 第 3 5 5 号

学位授与年月日 平 成 7 年 3 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 経口レニン阻害剤の開発研究

論文審査委員 (主 査)
教授 金子 主 税 教授 佐 藤 進

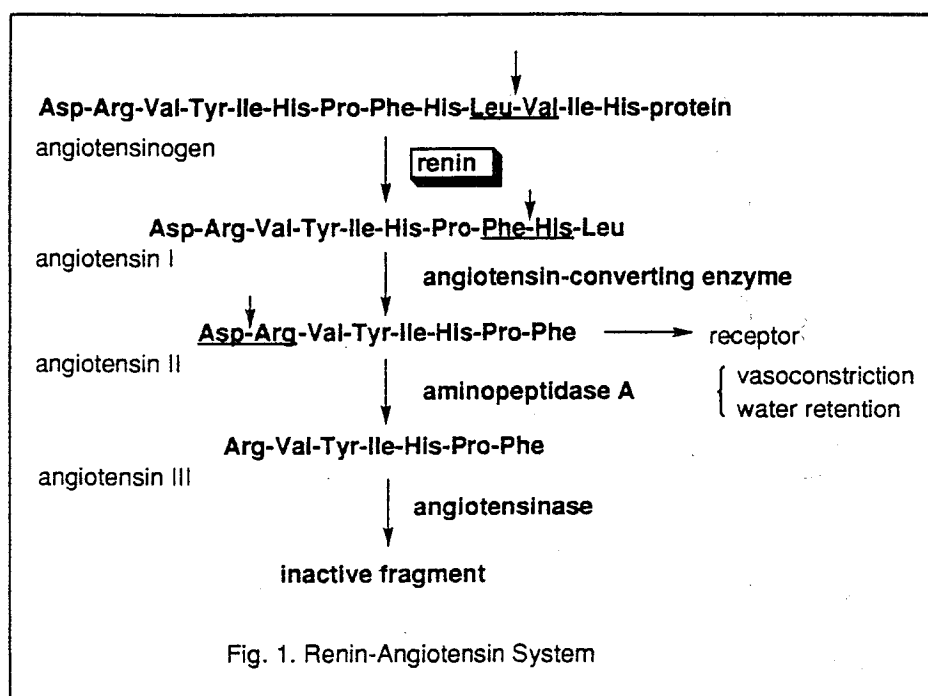
教授 小笠原 國 郎

論文内容要旨

1. 序

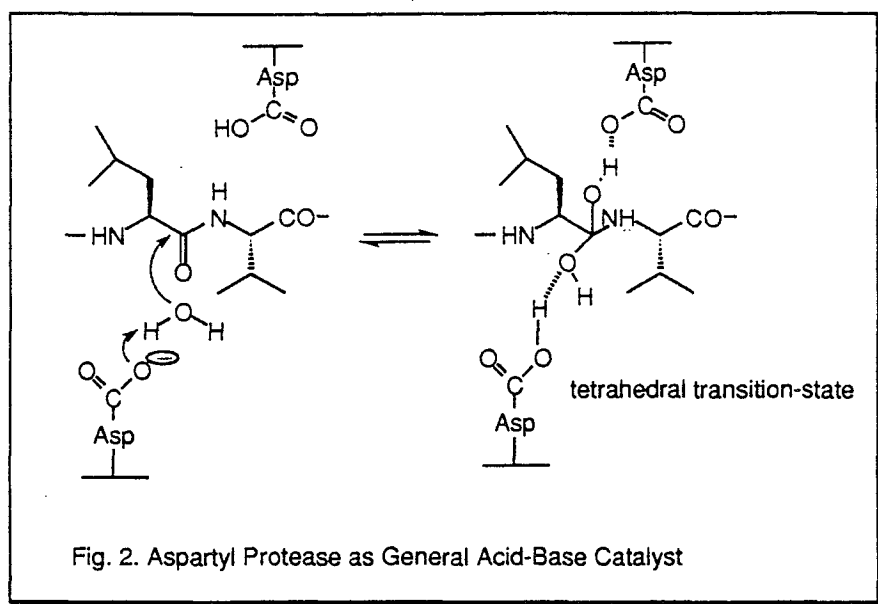
本研究は、経口降圧薬としてレニン阻害剤を開発することを目的に行ったものである。

高血圧の薬物療法は降圧利尿薬が開発されて以来、著しく進歩し、最近ではアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬が、降圧利尿薬、 β 遮断薬、カルシウム拮抗薬と並んで、有用な降圧剤として広く臨床で用いられている。ACE 阻害剤の成功によりレニン-アンジオテンシン系 (R-A 系, Fig. 1) が、高血圧の発症や維持に深く関わっていることが明らかとなり、レニン阻害剤の開発が世界中で行われている。

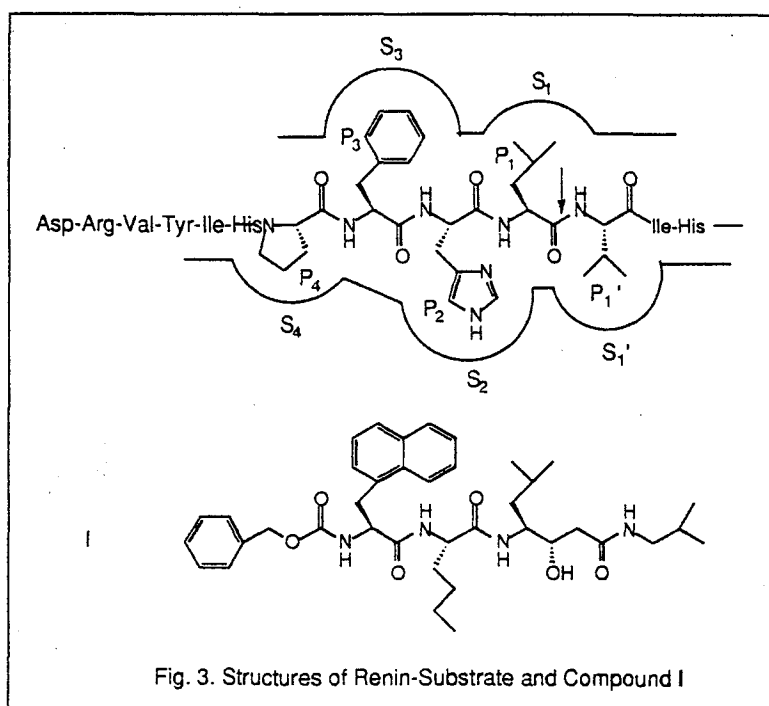


レニンは、腎の傍糸球体細胞から遊離される蛋白分解酵素で、その活性中心に2個のアスパラギン酸残基を有するアスパルティックプロテアーゼであり、アンジオテンシノーゲン (Ang) に作用してデカペプチドであるアンジオテンシン I (Ang I) を生成する。Ang I は、生理活性を持たず ACE によりオクタペプチドのアンジオテンシン II (Ang II) に変換される。Ang II は、末梢動脈のレセプターに作用して強い血管収縮を起こすと同時に、アルドステロンの分泌を促進し、血圧を上昇させる。ACE は、Ang I のみならずブラジキニンやサブスタンス P、エンケファリン等も基質として水解するので、ACE 阻害薬の血圧降下作用には、R-A 系以外の機構の関与も否定できない。また、この非特異性が、ACE 阻害薬の副作用である皮膚発赤、空咳等の原因につながっていると考えられる。レニンは、R-A 系の律速酵素であり、生体内のレニン基質としてはアンジオテンシノーゲンのみが知られている。従って、レニン阻害剤は、副作用の少ない降圧剤になりうると同時に、R-A 系についてのより一層の理解と病体生理的役割の解明をもたらすものと期待される。

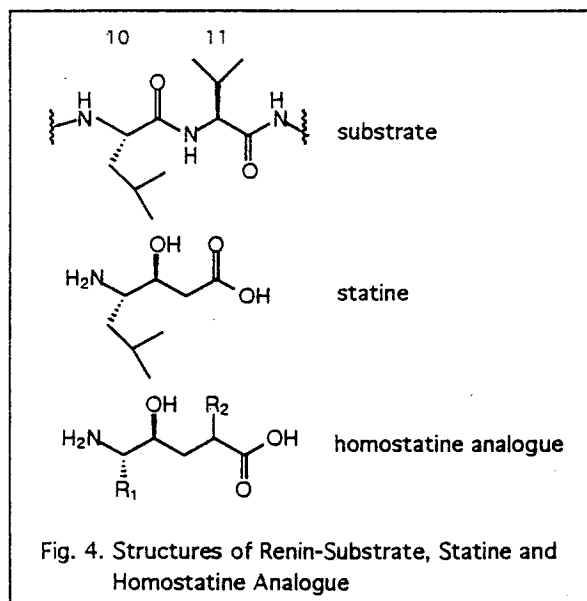
レニンがアンジオテンシノーゲンを水解するとき, Fig. 2 に示す正四面体構造を持つ遷移状態 (tetrahedral transition-state) を経由すると考えられている。



この過程を阻害する構造として transition-state analogue という考え方があり, アミノアルデヒドや β -ヒドロキシ- γ -アミノ酸である statine 類縁化合物が知られている。著者は, 活性中心に statine [(3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid] を含む化合物を初めに合成し, レニン阻害活性や, 合成の容易さなどから化合物 I をリード化合物として研究を開始した。



2. Hydroxyethylene isostere (Homostatine analogue) を含むレニン阻害剤



換基がエチル基より小さくとも、大きくとも阻害活性は低下した。また、BW-039 に含まれるジアステレオマーのうち活性体のエチル基の配位は *R*-配位であり、これは *L*-アミノ酸の配位と一致することを明らかにした。

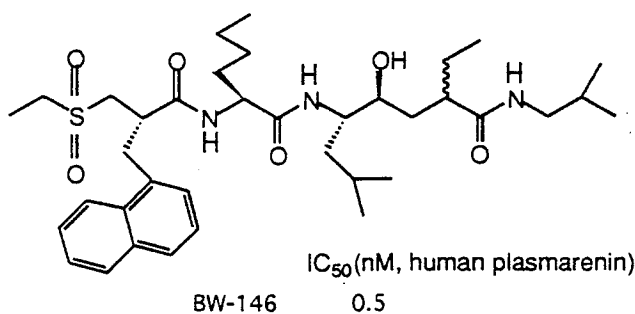
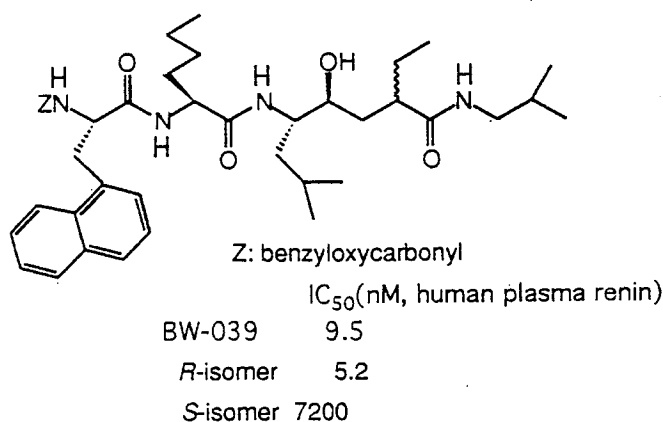


Fig. 4 に示すようにスタチンは基質に比べ、メチレンひとつ分短いため著者はより遷移状態に近い homostatine analogue を分子内に導入すれば阻害活性が上昇するものと考え、homostatine analogue を含む化合物の合成を行った。

Homostatine analogue を含む阻害剤は他のグループからも報告されているが、2位の置換基を検討している例はほとんどなく、ヒトアンジオテンシノーゲンの水解部位が Leu-Val であるため、合成されているホモスタチン誘導体の多くは2位にイソプロピル基を有している。しかしながら、著者の結果ではエチル基の方がイソプロピル基よりも高活性であり、2位の置

更に、P₁-P₃-P₄ の組み合わせが活性に重要であり、P₁-P₃ の組み合わせが最適な場合には、P₄ を取り去ることが可能であることを示した。また、このことからレニンにおいては S₁-S₃-S₄ が大きな疎水性コアを形成していることを推定した。

BW-039 に代表される、homostatine analogue を含む一連の化合物は *in vitro* の阻害活性は強いもののまだ酵素特異性が低く、iv 投与後、血中からの消失が早く、経口吸収性もほとんど示さなかった。

この欠点の改善を目指して、BW-039 の N 端側の修飾を行った。その結果、BW-146 に代表される N 端に sulfonemethylene isostere を有する化合物に高いレニン阻害活性が見られた。

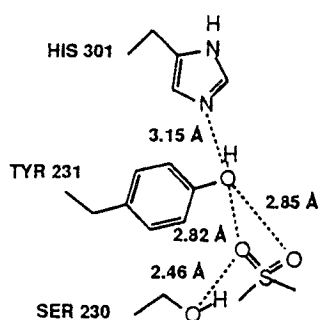


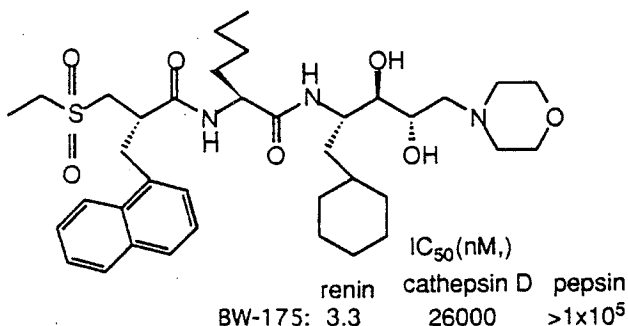
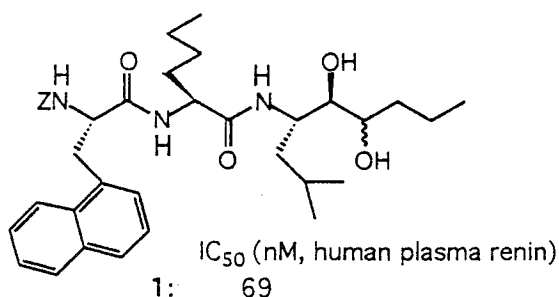
Fig. 5. Schematic Representation of Distances between the Sulfonyl Group of BW-146 and Surrounding Residues of Renin

BW-039 との活性の差をコンピューターを用いたモデリングスタディーにより解析し、BW-146 は無駄なくレニンと van der Waals 接触を保っており、更に、Fig. 5 に示すように sulfonyl 基はレニンと水素結合を形成するよい位置にあることがわかった。これらの相互作用の結果として BW-146 の阻害活性が BW-039 に比べ

大きく向上しているものと考えられる。

しかし、未だ BW-146 は酵素特異性が低くラットにおける生物学的利用率 (bioavailability) が 0.73 % と大変低かった。

3. Dihydroxyethylene isostere を含むレニン阻害剤



BW-146 の bioavailability が低いのは分子全体の脂溶性が高すぎるためと考えられ、著者は水溶性の向上を目的に新規の transition-state analogue の探索を行った。その結果、化合物 1 の様に活性中心に dihydroxyethylene isostere を含む化合物がレニン阻害活性を持つことが明らかとなった。

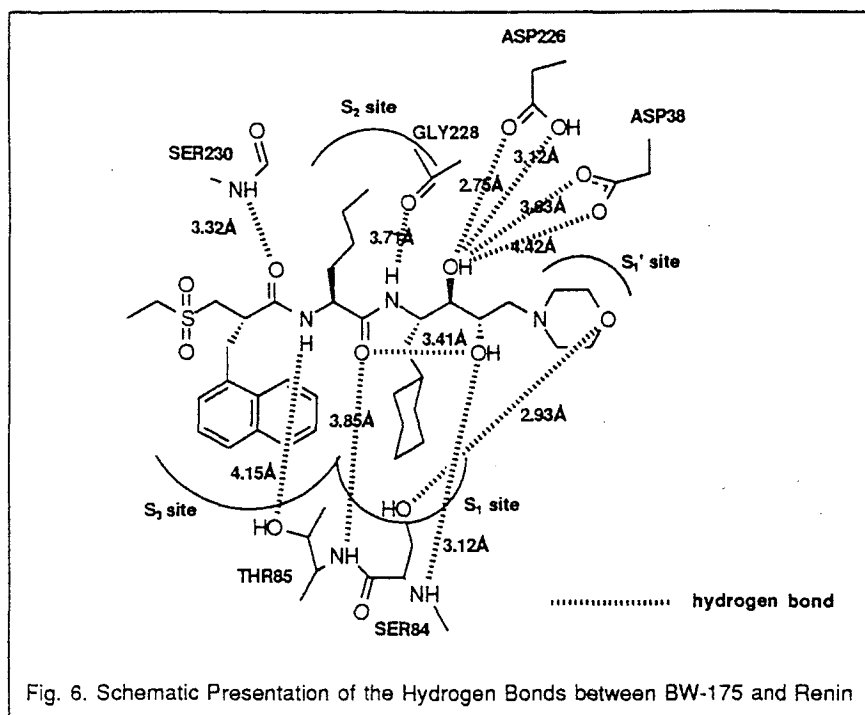
より高活性のものを求め、N 端、C 端の変換を行い、N 端に sulfonemethylene isostere を、活性中心に (2*S*,3*R*,4*S*)-4-amino-5-cyclohexyl-1-morpholino-2,3-pentanediol (ACMP) を含む BW-175 を創出した。

BW-175 は水溶性 (0.1M クエン酸に対して 42 mg/ml) も増し、レニンに特異的であった。この

特異性には、ACMP 中のモルホリノ基が大きく関与している。BW-175 とレニンとの相互作用をコンピューターを用いたモデリングスタディーにより解析した結果を Fig. 6 に示す。

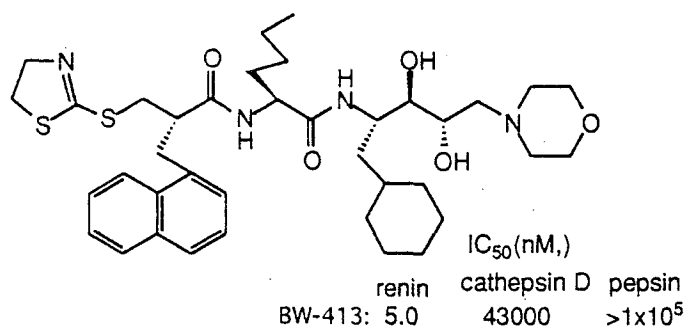
豚ペプシンは、レニンの Ser⁸⁴ が Gly に変わっているために ACMP のモルホリノ基と水素結合することができず、酵素選択性が出ているものと考えられる。

BW-175 のラットでの 8 時間までの AUC から求めた bioavailability は 10mg/Kg 投与で 2.8%, 30mg/Kg 投与で 9.7% であり、BW-146 に比べかなりの改善が見られた。



BW-175 をフロセミド誘起高レニン、正常血圧マウスに 30mg/Kg, po 投与後の収縮期血圧を Fig. 7 に示す。BW-175 は、経口投与可能なレニン阻害剤であることが明らかとなった。しかし、低用量時の降圧効果が充分ではなく、より降圧の強い化合物を目指し BW-175 の誘導体化を行った。

コンピューターモデリングから P₄-P₅ サイトの部分が多く開いていることがわかり、この部分の変換はレニン阻害活性に大きな影響を与えず、阻害剤の物理的性質を変えることが可能であると考え、N 端側の変換を中心に行った。Fig.5 に示すようにレニンの P₄ サイト周辺には Ser,



Tyr 等の親水性基が多いことからヘテロ原子を持った置換基の導入を中心に行い、その結果 BW-413 を見いだした。

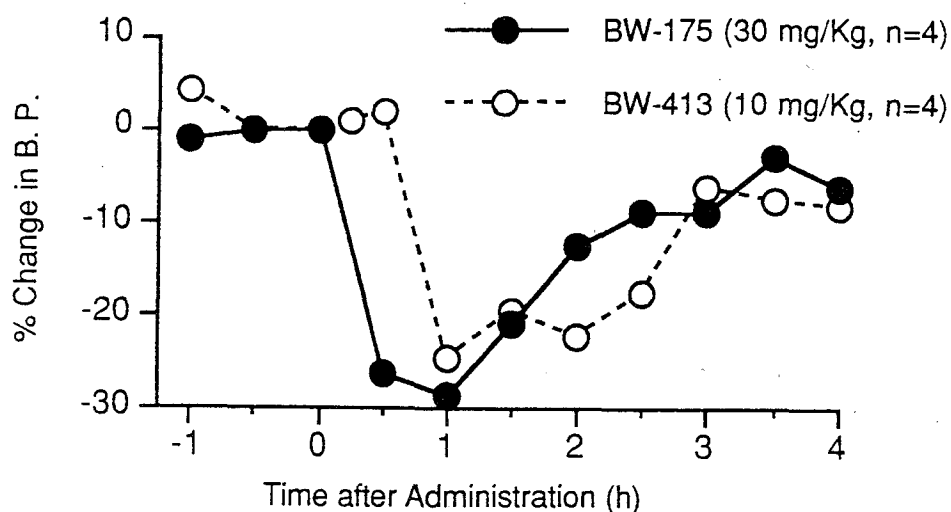
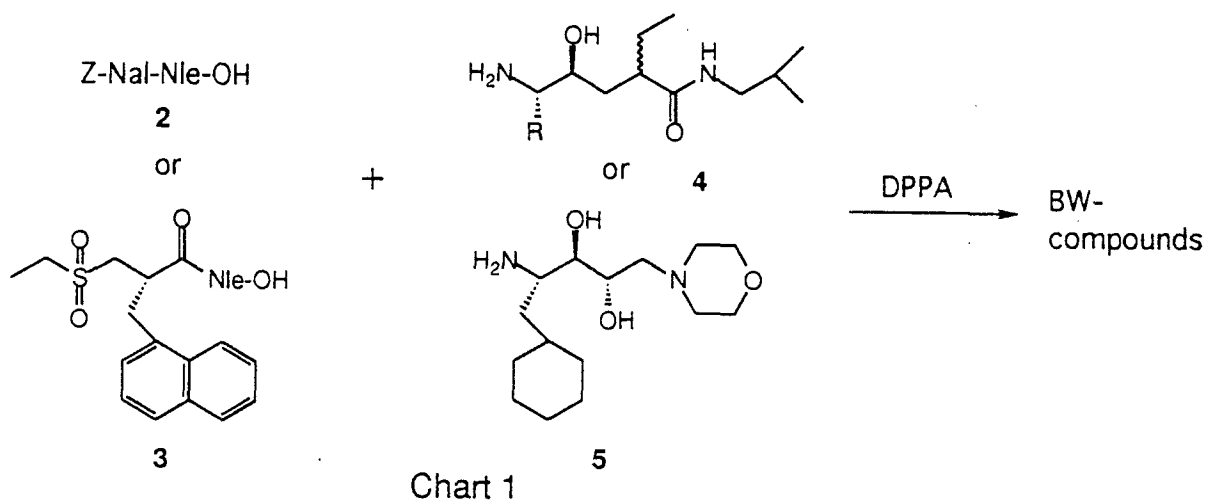


Fig. 7. Systolic Blood Pressure after Oral Administration

BW-413 を 10mg/Kg フロセミド誘起高レニン，正常血圧マウスに po 投与した結果を Fig. 7 に示す。BW-413 は BW-175 を上回る降圧を示し，更に，レニンに特異的であった。

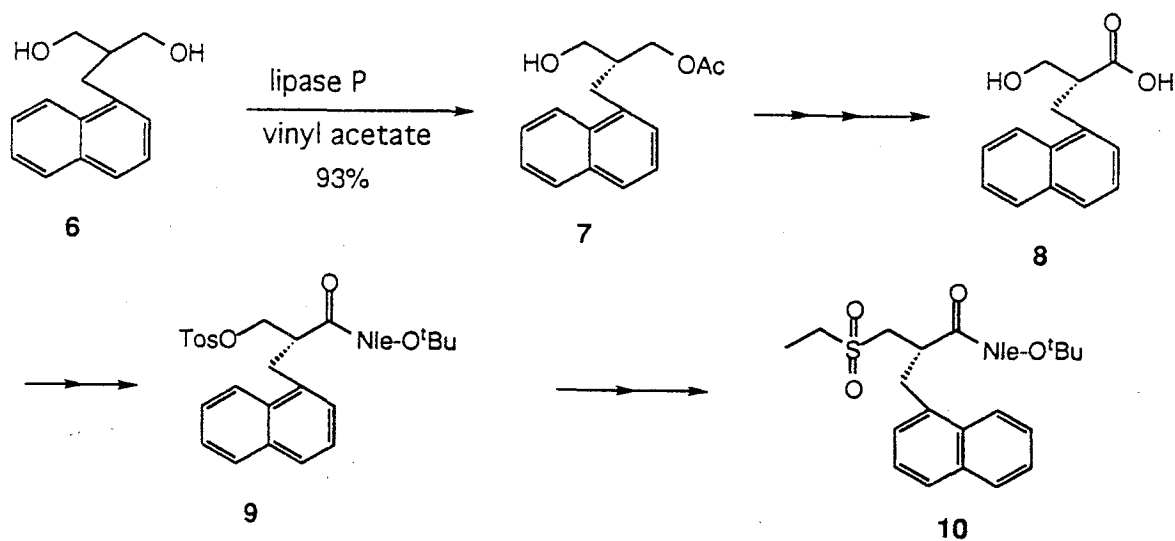
4. レニン阻害剤の合成

阻害剤の合成は基本的に Chart 1 に示すように P₄-P₃-P₂ 部（N 端側）を初めに合成し，最後に homostatine analogue あるいは ACMP をジフェニルリン酸アジド（DPPA）等の縮合剤を用いて縮合した。阻害剤は不斉炭素を多く持ち，かつ，その絶対配位がレニン阻害活性に大きな影響を与えることからその構築が key step となる。代表的化合物である BW-039 及び BW-175 の合成を示す。



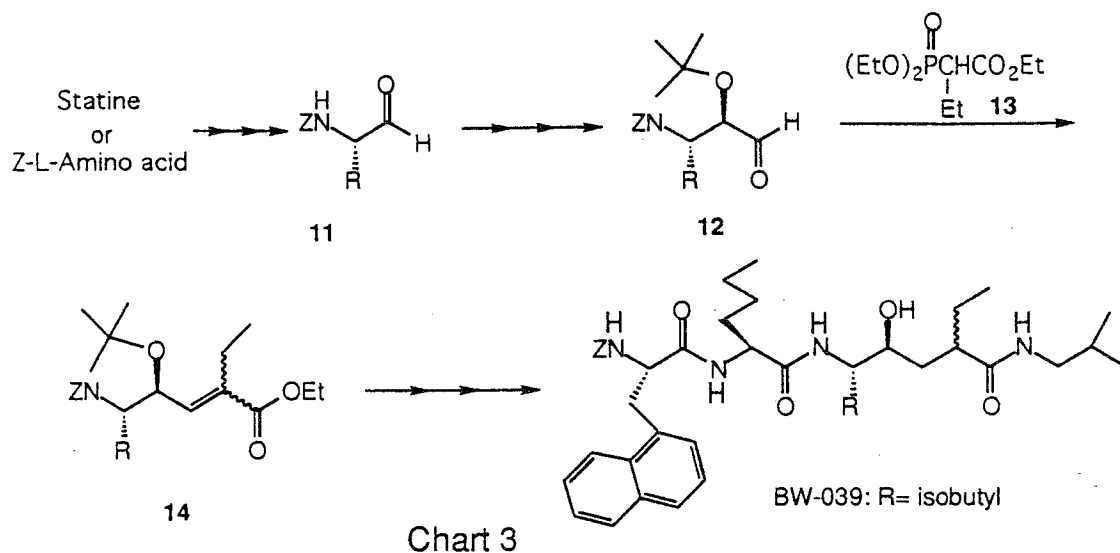
3-(1-ナフチル)-L-アラニン（Nal）は Erlenmeyer 法により合成した *N*-ベンゾイル体をアシラーゼ（*Streptomyces rimofaciens* 由来）により不斉加水分解して合成し，常法により Z-Nal-Nle-OH（2）に導いた。

BW-146 及び BW-175 に含まれる N-端側（3）は Chart 2 のルートにより合成した。

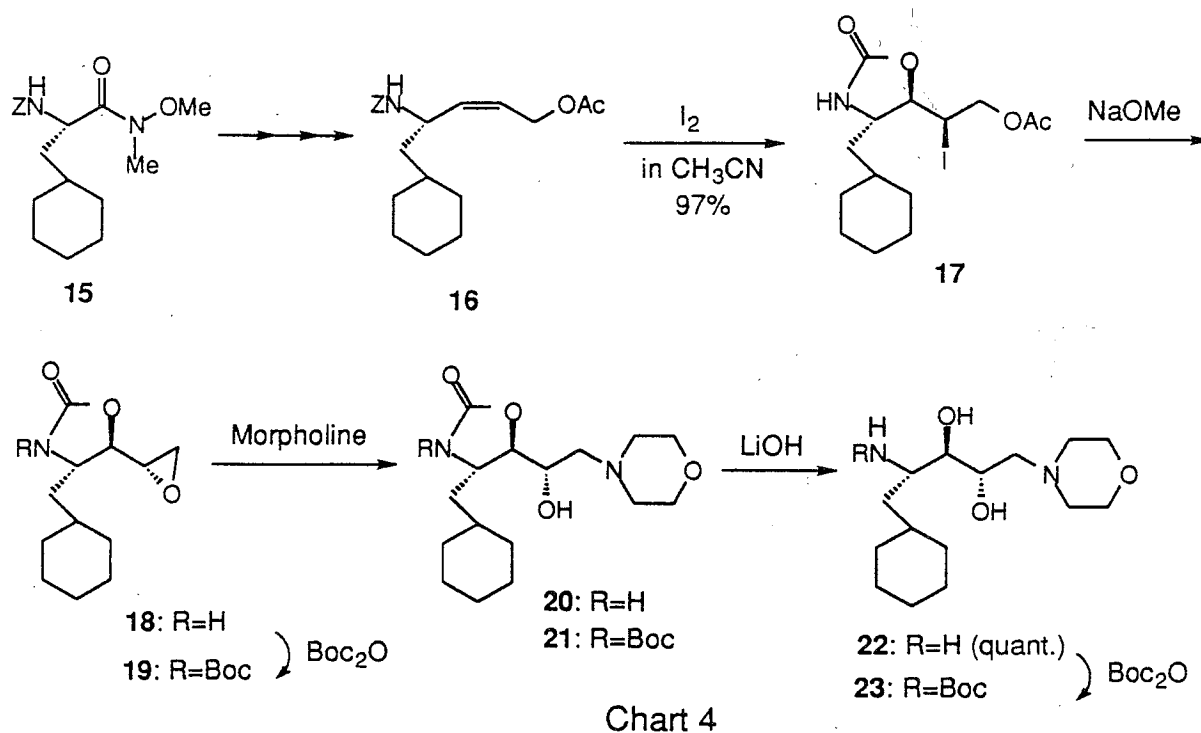


鍵中間体である 3-ヒドロキシ-2-(1-ナフチルメチル)-プロピオン酸 (8) は、ジオール体 (6) よりリパーゼ P を用いて合成した。

Hydroxyethylene isostere (Homostatine analogue) を含むレニン阻害剤の合成は、Chart 3 に示す様に行った。



P₁ フラグメントはアルデヒド 12 とし、また P₁' フラグメントはホスフォネート 13 として Horner-Emmons 反応により導入した。



ACMP (22) の合成は、著者の研究室から 1,2 : 5,6-di-isopropylidene-D-allo-furanose 或いは

divinylcarbinol から出発する方法が、また、小林らにより非天然型の (2*S*,3*S*)-tartaric acid を出発原料とする方法が報告されている。しかし、いずれも工程が長い、不斉収率が低いなどの欠点を有している。

著者はこれらの問題を解決した ACMP (22) の合成法を Chart 4 に示す様に確立した。3-Cyclohexyl-L-alanine より得られる hydroxyamide 14 をアセテート体 15 に導き、CH₃CN 中、ヨウ素で処理し高立体選択的にヨードカルバメート体 16 を得た。他のジアステレオマーは ¹H-NMR によって観測されず、反応は高立体選択的に進行したことは明らかである。この高い選択性は A-strain concept により説明できる。化合物 16 をアルカリで処理後、モルホリンと反応させ化合物 19 とする。化合物 19 のオキサゾリジノンを水酸化リチウムにより加水分解し ACMP (22) を得た。

以上のように、ACMP を 3-Cyclohexyl-L-alanine より立体選択的に、高収率で合成することができた。

以上、著者は、新規の transition-state analogue である dihydroxyethylene isostere を含む化合物が強くレニンを阻害することを見だし、特に (2*S*,3*R*,4*S*)-4-amino-5-cyclohexyl-1-morpholino-2,3-pentanediol (ACMP) を部分構造に有する化合物の中から、BW-175 及び BW-413 に代表されるレニンに特異性が高く、経口吸収性にも優れた経口投与可能なレニン阻害剤の開発に成功した。更に、A-strain concept に基づく立体制御により、ヨードカルバメーション反応を用いて、高立体選択的に ACMP を 3-Cyclohexyl-L-alanine より導く簡便な合成法を確立し、上述のレニン阻害剤を立体選択的に合成した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は経口降圧薬としてレニン阻害剤を開発することを目的に行ったものである。レニンは腎の傍子球体細胞から遊離される蛋白分解酵素で2個のアスパラギン酸残基を持つアスパルテックプロテアーゼであり、アンジオテンシノーゲンに作用してアンジオテンシンIを生成する。このものは生理活性を持たないが、これがACE（アンジオテンシン-コンバーティングエンザイム）によりアンジオテンシンIIに変換されると強い血管収縮を起こし血圧を上昇させる。著者は従来の趨勢であるACE阻害薬の探索とは別に、レニン阻害作用をもつ化合物がより選択性の高い降圧剤となりうると考えた。そして第1章で述べるようにレニンがアンジオテンシノーゲンを水解する際の正四面体構造の構造に類似するホモスタチン類縁体化合物をリード化合物として研究を開始した。

まず第2章ではホモスタチンアナログの合成を行った。その結果2位にエチル基を持つものが最も高い活性を示すことを明らかにした。またそれらのジアステレオマーを分離して、エチル基の配置は*R*-配置をもつものが活性体であることをつきとめた。またホモスタチンのC端とN端における分子の構造が阻害活性に大きく係わっていることから、レニンにおける疎水コアの存在を明らかにした。このようにして、BW-039に代表される阻害活性を持ついくつかのホモスタチン類縁体を見い出したが、これらはいずれも経口吸収性を示さなかった。BW-039のN-端をsulfonemethyleneにしたBW-146はBW-039より大きく阻害活性は増大したが、この理由をコンピューターを用いたモデリングスタデーにより解析し、レニンとの親和性がその原因であることをつきとめた。

第3章ではBW-146の水溶性を増大すべくそのdihydroxyethylene isostereを合成した。また、N端、C端に化学修飾を行いN端にsulfonemethyleneをまた活性中心に(2*S*,3*R*,4*S*)-4-amino-5-cyclohexyl-1-morpholino-2,3-pentanediol (ACMP)を持つBW-175を創出した。

この化合物のコンピューターモデリングから親水性を高めるためヘテロ原子を持つ置換基の導入を行いBW-413に到達した。この化合物は経口投与でBW-175を上回る降圧効果を示した。

第4章においてはBW-039、BW-175およびBW-413のキラル合成を達成した。また、3-cyclohexyl-L-alanineを出発原料とするACMPの簡便な合成法を確立しBW-413の大量合成を可能とした。

以上、著者は新規のtransition-state analogueであるdihydroxyethylene isostereを含む化合物が強くレニンを阻害することを見い出した。そしてACMPを部分構造に有する化合物のなかからBW-175、BW-413に代表されるレニンに特異性が高く、経口吸収性にも優れたレニン阻害剤の開発に成功した。そしてACMPの簡便かつ立体選択的な合成にも成功し、上述のレニン阻害剤の大量製造へのルートをも確立した。

以上本論文はBW-413に代表される多くの新規な経口レニン阻害剤の創製を行ったものであり、その過程はmedicinal chemistryの観点から価値が高く、またそれら化合物の簡便かつ効率的な合成法の確立は有機化学の観点から高く評価できる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分な内容を持つと認める。